

**Experimentelle Studien zur Frage
der Abhängigkeit des Coeruloplasminspiegels
von Oestrogenen**

von
Johann Ehrmeier
aus
Ingolstadt/Donau

1972 № 39 8

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Experimentelle Studien zur Frage der Abhängigkeit des Coeruloplasminspiegels von Oestrogenen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Johann Ehrmeier

aus

Ingolstadt/Donau

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1972

Beziehungen zwischen Oestrogenen und Coeruloplasminspiegel sind erstmals im Jahre 1949 von THOMPSON und WATSON (32) aufgedeckt und seither bis in die jüngste Vergangenheit beobachtet worden. Ein erhöhter Coeruloplasminspiegel wird z. B. regelmäßig im letzten Drittel (2, 7, 9, 15, 19, 21) der Schwangerschaft festgestellt, wobei hier die erhöhte endogene Oestrogenbildung verantwortlich gemacht werden muß (30). Bereits 1950 beobachteten TURPIN und Mitarb. (33), ebenso wie wenige Jahre später ELSNER und HORNYKIEWICZ (11) sowie RUSS und RAYMUNT (27), daß auch auf die exogene Applikation von Oestrogenpräparaten der Serumkupferpiegel merklich ansteigt. Es ist eine klinische und klinisch-chemische Erfahrungstatsache, daß jegliche Erhöhung des Oestrogenspiegels, ungeachtet seines Bildungs- oder Akquirierungsmodus eine Erhöhung des Coeruloplasminspiegels nach sich zieht (6, 13). Neueste Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß eine Oestrogenvermehrung nicht nur das Coeruloplasmin, sondern auch andere Serumproteine, hier insbesondere das corticosteroid-bindende Globulin (9, 22), das thyroxinbindende Globulin (10, 12), sowie Lipoproteine (36) zu aktivieren vermag; α_2 - Makroglobulin wird, entgegen früherer Annahme (18), durch Oestrogen nicht beeinflußt (1).

Die moderne Oestrogentherapie und insbesondere der wesentlich

größere Konsum solcher Hormonpräparate können unzweifelhaft entsprechende Wirkungen auf Serumfaktoren verursachen. Dabei muß offen bleiben, ob die Vermehrung von Coeruloplasmin in jedem Fall durch eine Aktivierung coeruloplasminbildender oder lediglich durch erhöhte Freisetzung α_{2C} -speichernder Zellen, etwa der Leber bedingt wird.

In vorliegender Studie sollte im Experiment geprüft werden, ob unter Applikation von Oestrogenen bei Tieren beiderlei Geschlechts eine Anreicherung von α_{2C} induziert werden kann. Außerdem sollte versucht werden, den Mechanismus dieser Coeruloplasminanreicherung unter Oestrogenen aufzuklären.

I) Untersuchungsgut, Versuchsanordnung und Methodik

1) Untersuchungsgut :

Es wurden insgesamt 20 Albinoratten⁺) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 160 g in Versuch genommen. Unter ihnen befanden sich 10 weibliche und 10 männliche Tiere. Außerdem wurden insgesamt 18 Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von 2000 g in die Versuchsserie aufgenommen, unter ihnen 8 weibliche und 10 männliche Tiere (s. auch Tabelle 1).

2) Versuchsanordnung :

Die Ratten wurden in 3 Gruppen eingeteilt :

Gruppe A erhielt nach der in Abb. 1 b angegebenen Applikationsfolge jeden 2. Tag 5 mg pro Tier durch Injektion eines Oestrogenpräparates⁺⁺) subkutan appliziert.

Gruppe B erhielt einmal zu Versuchsbeginn 50 mg pro Tier durch Injektion eines Depot-Oestrogenpräparates⁺⁺⁺) intramuskulär verabreicht.

Gruppe N wurde unbehandelt beobachtet.

Die Kaninchen wurden ebenfalls in 3 Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 1).

Die Behandlung erfolgte im Prinzip wie die der Versuchsserie der Ratten (s. Abb. 1 a).

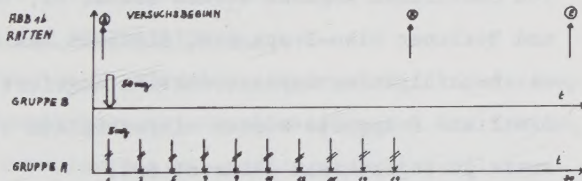
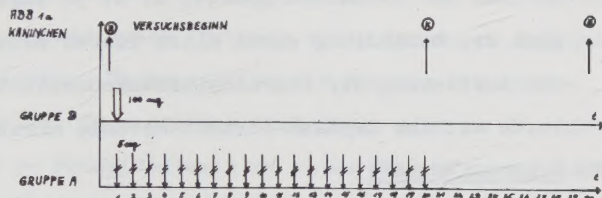
⁺) Wistar Hannover
⁺⁺) Progynon B-oleosum Ampullen zu 5mg Oestradiolbenzoat der Fa. Schering
⁺⁺⁺) Progynon-Depot 100mg Ampullen zu 100ml Oestradiolundecylat

TAB.1

GRUPPE	GESCHLECHT	Injektion (s.o.) von 5 mg eines Ochrogen-Präp. x 2 jeden 1. Tag		Einmalige i.m.- Injektion eines Depot-Ochrogen-Präp. ¹⁴	
		R	K	50 mg	100 mg
A	♂	4	4		
	♀	4	4		
B	♂			4	4
	♀			4	4
ohne Behandlung					
N	♂	2	2		
	♀	2			

Tab. 1

Untersuchungsgut der vorliegenden Versuchsreihen
in Zuordnung zur unterschiedlichen Behandlung.



- ① = AUSGANGSWERTE
 ② = KONTROLLUNTERSUCHUNG
 ③ = ENDKONTROLLE

Abb. 1a, b): Behandlungspläne für die beiden Versuchsreihen

Im einzelnen wurden bei allen Tieren folgende Analysen vorgenommen :

a) Serumanalysen :

Vor Versuchsbeginn sowie 20 Tage unmittelbar nach Abschluß der Behandlung mit Oestrogenen und schließlich am Ende der Beobachtungszeit, d. h. 30 Tage nach Beginn der Behandlung wurde allen Tieren Blut entnommen zur Bestimmung der Coeruloplasminkonzentration ; diese wurde mit der Oxydase-Ferment-Methode ermittelt.

b) Organanalysen :

Am Ende des Versuches wurden sämtliche Tiere im Ätherrausch getötet, entblutet und ihnen folgende Organe entnommen : Leber, Milz, Niere und Ovarien.

Von sämtlichen Organen wurden sowohl HE, Turnbull Blau- und Berliner Blau-Präparate, als auch Nativpräparate mit nachfolgender Oxydasereaktion angefertigt.

Sämtliche Präparate wurden mikroskopisch beurteilt sowie photographisch dokumentiert.

3) Methodik :

a) Blutentnahme :

Bei Ratten erfolgt die Blutentnahme aus einer Schwanzvene durch Kappen der Schwanzspitze, bei Kaninchen durch Anritzen einer peripher gelegenen Ohrvene. Das Blut wurde jeweils in Tropfen aufgefangen, 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, danach bei 1500 U/min in einer Normalzentrifuge zentrifugiert und das überstehende Serum sorgfältig abpipettiert. Es wurden nur

lipämie- und hämolysefreie Seren verwendet.

b) Oxydase-Reaktion im Serum :

α) Prinzip der Methode :

Das bereits 1957 von URIEL (in 14, 29, 35) ausgearbeitete und auf erste Untersuchungen von HOLMBERG und LAURELL (17 c) zurückgehende Prinzip besteht in der Kombination von elektrophoretischer Trennung eines Serums im Agargel und nachfolgender Enzymreaktion mit Messung des Oxydationsproduktes. Im einzelnen handelt es sich um die Oxydation von p- Phenylendiamin zu einem Chinonderivat durch die Oxydaseaktivität des Coeruloplasmins. Diese Chinonverbindung ist wasserunlöslich. Sie geht mit einer Braunfärbung einher, deren Intensität ein Maß für die Fermentaktivität des Coeruloplasmins darstellt.

β) Herstellung der Agarplättchen :

Mit verflüssigtem Elektrophoreseagar wird für jede Analyse ein Objektträger mit den Abmessungen 2,6 x 7,6 cm, der an den Schmalseiten mit puffergetränktem Filterpapier belegt ist, 0,3 cm überschichtet. Nach Erkalten des Agars wird in der Medianlinie des Objektträgers die Auftragestelle (10 x 2 mm) für die Aufnahme des zu untersuchenden Serums gestanzt. Danach erfolgt die Aufbereitung des Serums. 0,1 ml Serum, 0,05 ml aqua dest. und 0,15 ml Agar werden im Wasserbad zwischen 37° C und 40° C gemischt. Von diesem Serum-Agar-Gemisch werden in die vorbereiteten Vertiefungen der Elektrophoreseplatte je 0,1 ml eingelassen und nach Erkalten mit

blankem Agar überzogen. Die Elektrophorese im Agar erfolgt bei einer Gleichspannung zwischen 90 - 110 V bei Zimmertemperatur; sie ist zwischen 4 und 6 Stunden abgeschlossen. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Filterstreifen von den Agarplättchen abgetrennt.

8) Fermentreaktion :

1) Reagenzien :

Na- Acetat $\cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa. Merck)

Eisessig

50 %iger Alkohol (Aethylalkohol)

p- Phenylendiamin (Fa. Merck)

Natriumazid (Fa. Fluka AG Buchs SG)

2) Herstellen der Lösungen :

Lösung I :

p- Phenylendiamin in Natriumacetat-Puffer pH = 5,7. Hierzu werden im einzelnen erst folgende Lösungen hergestellt :

a) Eisessig 12,006 g

aqua dest. ad 1 l

b) Na- Acetat $\cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ 27,199 g

aqua dest. ad 1 l

Von der unter a) angegebenen Eisessiglösung werden 95,0 ml mit der unter b) angegebenen Na- Acetatlösung ad 1 l aufgefüllt. Dieser Puffer mit einem pH von 5,7 und einer Ionenstärke von $\mu = 0,1$ kann eine Zeit lang aufbewahrt werden.

c) Natriumazid 0,650 g

aqua dest. ad 1 l

Diese Natriumazidlösung ist ebenfalls beständig.

Wichtig ist, daß das eigentliche Reagens, die p- Phenylendiamin- Lösung jeweils unmittelbar vor Gebrauch bereitet werden muß. Hierzu werden 64,8 mg p- Phenylendiamin in 300 ml des Na- Acetat- Puffers pH = 5,7 gelöst. Danach gibt man 30 ml von der Natriumazidlösung hinzu und erhitzt dieses Gemisch auf 37° C.

Lösung II :

Natriumacetat- Puffer pH = 4,7 (Ionenstärke $\mu = 0,1$)

a) Eisessig 12,006 g

50 %iger Alkohol ad 1 l

b) Na- Acetat $\cdot 3 H_2O$ 27,199 g

50 %iger Alkohol ad 1 l

Von der Essigsäurelösung unter a) werden 455,0 ml mit der unter b) angegebenen Na- Acetatlösung ad 1 l aufgefüllt. Gut verschlossen ist dieser Puffer haltbar.

d) Arbeitsgang :

Die Agarelektrophoreseplättchen werden bei 37° C (im Wärmeschrank) 2 bis 4 Stunden lang in eine entsprechend große Küvette mit Lösung I zum Färben gelegt. Danach werden sie zweimal nacheinander je 2 Stunden lang im Na- Acetat- Puffer pH = 4,7 (Lösung II) gewaschen und anschließend bei 37° C getrocknet. Bei Behandlung mit Lösung I wird das in dieser Lösung enthaltene p- Phenylendiamin durch die Fermentaktivität des Coeruloplasmins zu einer Chinonverbindung unter Braunfärbung oxydiert; das pH des Puffers wird vom pH = 5,7 zu pH = 5,9 bis 6,0 verändert. Durch das Waschen mit Lösung II wird die Enzymaktivität abgebrochen und der Agar von überschüssigem, nicht oxydiertem p- Phenylendiamin befreit.

c) Dokumentation der Befunde :

Die braungefärbte Komponente läßt sich photometrisch auswerten. Hierzu werden die getrockneten Agarstreifen im Elphor-Integrapp (Fa. Dr. Bender und Hobein, München) mit Filter Nr. 546 integriert. Die dabei faßbaren Planimeterwerte können zugleich als Maß für die Enzymaktivität der Coeruloplasminfraktion gelten.

d) Histochemischer Oxydasenachweis :

Von den oben genannten Organen wurden nach Einfrieren mit Kohlendioxydschnee (mit dem Mikrotom) Gefrierschnitte (Nativpräparate) von $10\ \mu$ Schichtdicke hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Die beschichteten Objektträger werden in eine Küvette mit Lösung I gelegt und bei 37°C 2 bis 4 Stunden lang inkubiert und anschließend in Lösung II gebracht, um die Reaktion zu beenden. Mit einem Deckglas wurden die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt.

e) Anfertigung histologischer Schnitte :

Die Techniken erfolgten in herkömmlicher Weise (5). Die Organproben (4 mm dick) wurden bei Zimmertemperatur in 10 %igem Formalin 24 Stunden fixiert. Darauf 1 Stunde in fließendem Wasser gewässert und anschließend im Autotechnikon in üblicher Weise entwässert. Nach Einbettung der Gewebeproben in Paraffin wurden mit dem Mikrotom $4\ \mu$ dicke Schnitte angefertigt. Im Brutschrank wurden die Schnitte 1 Stunde bei 60°C getrocknet und darauf in Xylol entparaffiniert.

Anschließend durchliefen sie je nach späterer Färbung eine absteigende Alkoholreihe entweder bis zum 70 %igen Alkohol (bei Berliner Blau und Turnbull Blau- Färbung) oder bis zum Wasser (bei HE- Färbung).

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren :

α) Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE) :

Vorgehen : Entparaffinierte Schnitte auf Objektträger aufgezogen aus Aqua dest.

- 1) Hämalaun 7 - 10 min.
- 2) in Aqua dest. spülen
- 3) Leitungswasser (fließend oder einmal wechselnd) 15 min.
- 4) Aqua dest.
- 5) Eosin 0,5 - 1 min.
- 6) Differenzieren in Alkohol oder Wasser
- 7) Aufsteigende Alkoholreihe (70 - 96 - 100 %ig je zweimal) je 2 min.
- 8) Xylol
- 9) Eindecken mit Kanadabalsam (Eukitt).

β) Vorgehen zur Berliner Blau- Reaktion (auf Fe^{III}) :

- 1) die Schnitte kommen entparaffiniert für 15 min. in eine Lösung aus 2 %igem gelben Blutlaugensalz (Ferrocyankalium) und 1 %iger HCl zu gleichen Teilen,
- 2) spülen in Aqua dest.
- 3) spülen in 1 %igem Kernechtrot (5 - 7 min.) oder Alaunkarmin (12 Stunden)
- 4) aufsteigende Alkoholreihe etc. (s. Angaben wie bei obiger Färbung.

Ergebnis : Eisen blaue Granula, Kerne rot.

8) Vorgehen zur Turnbull Blau- Reaktion (auf das zu Fe^{II} umgewandelte Gesamteisen) :

Entparaffinierte Schnitte auf Objektträger aufgezogen aus Wasser.

- 1) 10 %iges frisches Ammoniumsulfid (1 - 24 Stunden)
- 2) spülen in Aqua dest. (einmal wechseln) 1 Stunde
- 3) 20 %iges rotes Blutlaugensalz mit 1 %iger HCl zu gleichen Teilen frisch bereitet (10 min.)
- 4) spülen in Aqua dest.
- 5) 1 %iges Kernechtrot (5 - 7 min.)
- 6) spülen in Aqua dest., entwässern etc. (s. Angaben wie bei obiger Färbung).

Ergebnis : Eisen als blaue Granula, Kerne rot, Zytoplasma rosa.

Für die Anfertigung der Schnitte, einschließlich der Spezialfärbungen sei Herrn Dr. Pesch (Pathologisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor : Professor Dr. E. Müller)) herzlich gedankt.

II) E r g e b n i s s e

1) Beobachtungen an den Tieren :

Die täglich mit Oestrogen behandelten Ratten und Kaninchen zeigten etwa nach 14 Tagen eine gewisse Inaktivität mit Nachlassen der Freßlust sowie eine struppige Beschaffenheit des Felles und stärkeren Haarausfall als die Tiere der Versuchsgruppe B und N. Bereits 8 Tage später jedoch schien sich dieses Phänomen verloren zu haben.

2) Ergebnisse der Coeruloplasminbestimmung :

Die Befunde sind in den Tabellen 2 a, b und c im einzelnen wiedergegeben. Es handelt sich bei diesen um die Planimeterwerte der photometrisch ermittelten Farbtintensitäten des Oxydationsproduktes von p- Phenylendiamin durch α_{20} - Oxydase.

3) Histochemische Befunde :

Die Befunde nach Behandlung der jeweiligen Gefrierschnitte mit Fermentsubstratlösung zum Nachweis oxydaseaktiver Strukturen haben bei Vergleich der nicht-behandelten Tiere mit denjenigen der behandelten keinen nennenswerten Unterschied ergeben. Es zeigten sich im einzelnen reichlich oxydasepositive Zellstrukturen : nukleäre sowie intrazelluläre, an der Niere offenbar auch positive Glomerulomembran bzw. kapilläre Reaktionen; im Bereich des Ovars fanden sich positive Oxydasereaktionen vor allem am System

TAB. 2a

Injektion (s.c.) von 5 mg eines Cellulosepräparates 12									
			R			K			
			A	K	E	A	K	E	
			PE	PE	PE	PE	PE	PE	
A	♂	1	11	23	87	9	47	116	
		2	10	40	78	14	39	95	
		3	14	36	83	27	51	130	
		4	9	20	94	12	32	79	
	♀	1	17	27	76	32	36	123	
		2	19	39	124	19	48	137	
		3	18	71	130	16	60	145	
		4	20	42	98	31	77	127	

TAB. 2b

Einmalige Injektion (i.m.) von 50(100) mg eines Depot - Cellulosepräparates 13									
			R			K			
			A	K	E	A	K	E	
			PE	PE	PE	PE	PE	PE	
B	♂	1	12	35	93	21	42	112	
		2	14	24	85	15	38	97	
		3	10	31	79	13	41	102	
		4	11	26	88	17	34	89	
	♀	1	20	31	97	30	41	118	
		2	17	45	101	19	56	137	
		3	16	39	87	27	61	141	
		4	19	62	91	32	59	121	

TAB. 2c

ohne Behandlung									
			R			K			
			A	K	E	A	K	E	
			PE	PE	PE	PE	PE	PE	
N	♂	1	10	14	10	12	19	24	
		2	11	12	9	17	18	28	
	♀	1	18	15	18				
		2	19	19	17				

Tab. 2a, b, c:

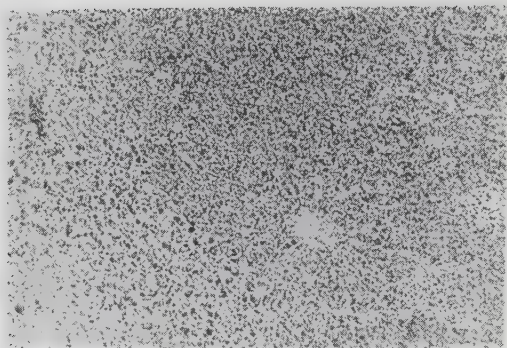
Befunde der Oxydase-Aktivität bzw. Coeruloplasmin-konzentration der beobachteten Tiere.
Die Zahlen stellen Planimetereinheiten (P.E.) dar.

der Follikel - Primär- wie auch Sekundärfollikel -
(siehe u. a. Abb. 2 a, b und c).

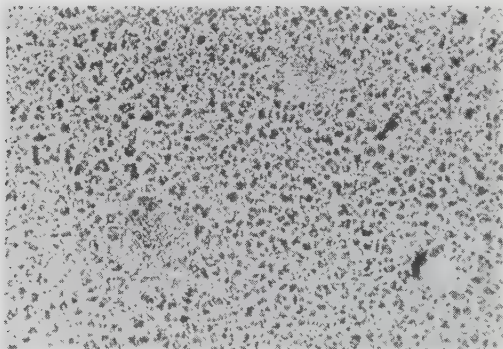
Die histologischen Befunde nach HE- Färbung konnten weder an der Leber, der Milz, der Niere noch am Ovar pathologische Veränderungen nachweisen. Das gilt für sämtliche beobachteten Tiere. Lediglich die Milz bot reichlich herdförmige Pigmentablagerungen in den Sinusoiden der roten Pulpa.

Diesem Milzbefund entsprachen die positiven Befunde nach Turnbull- sowie Berliner Blau- Reaktion. Dagegen wiesen alle übrigen untersuchten Organe mit diesen Spezialfärbungen keine positive Reaktion auf (vergl.

a)
Leber



b)
Niere



c)
Ovar

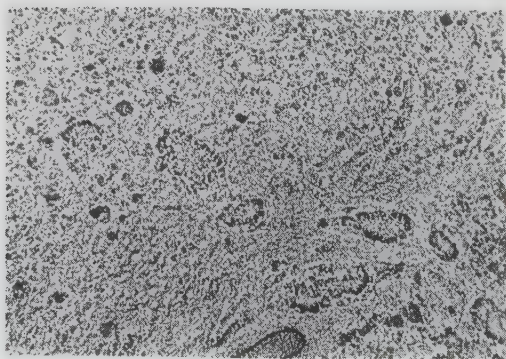
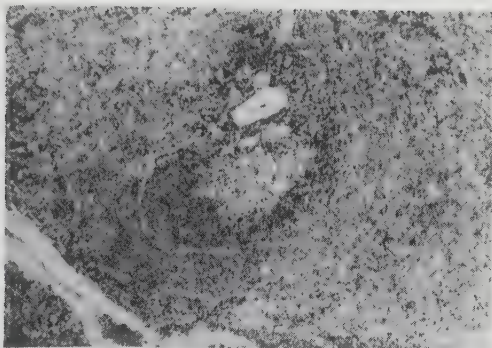


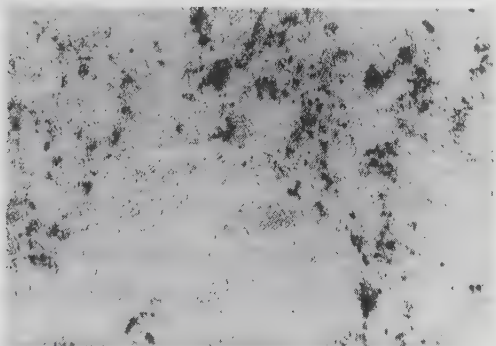
Abb. 2
(a - c)

Histochemischer Nachweis oxydaseaktiver Strukturen
in Leber, Niere und Ovar eines behandelten Kaninchens
(Vergr. 125 x)

a)
HE



b)
Berliner Blau



c)
Turnbull

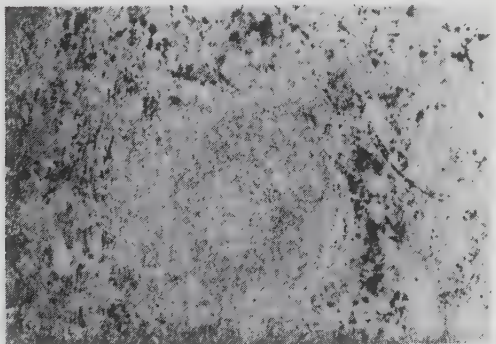


Abb. 3
(a-c)

Gegenüberstellung des H/E-gefärbten, das mit Berliner Blau-Reaktion sowie nach Turnbull-Reaktion dargestellten Präparates der Milz eines behandelten Kaninchens.

III) D i s k u s s i o n

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß unter der Verabreichung von Oestrogenen bei Ratten sowie Kaninchen beiderlei Geschlechts eine deutliche Anhebung des Coeruloplasminspiegels induziert wird, daß jedoch histologisch faßbare Veränderungen an Leber, Niere, Milz und, bei weiblichen Tieren, auch an den Ovarien nicht objektiviert werden können. Es konnten an den Organen weder Abweichungen in den oxydaseaktiven Strukturen noch in der Ablagerung von Eisen, aber auch nicht in bezug auf die parenchymatöse Beschaffenheit gegenüber unbehandelten Tieren festgestellt werden.

Das Verhalten der Tiere zeigte zwar temporäre Auffälligkeiten, sie können aber nicht ohne weiteres in Zusammenhang mit der Hormonbehandlung gebracht werden, da entsprechende objektive Beweise fehlen.

Die Versuchsergebnisse stehen in Einklang mit vorwiegend klinischen und klinisch-chemischen Beobachtungen am Menschen, wonach eine endogene oder exogene Erhöhung des Oestrogenspiegels zu einer Vermehrung des oxydaseaktiven Coeruloplasmins führen (2, 7, 9, 11, 15, 19, 21, 27, 30, 33). Sie beweisen darüber hinaus, daß die verwendeten Oestrogenpräparate, die sonst zur Substitutionstherapie in der Humanpathologie Anwendung finden, auch bei Kaninchen und Ratten einen offenbar gleichartigen Effekt bewirken.

Die biochemischen Vorgänge bei einem Wirkungskorrelat zwischen Oestrogen und Coeruloplasmin sind bis heute noch nicht eindeutig aufgeklärt. Betrachtet man jedoch den Stoffwechsel der Oestrogene und den des Coeruloplasmins, so können Möglichkeiten einer gegenseitigen Beeinflussung auf folgende Weise erklärt werden :

Unterstellt man intramuskulär oder peroral appliziertem Oestrogen den gleichen intrakorporalen Kreislauf wie physiologischerweise sezerniertem Oestrogen (3, 4, 8, 24, 28, 34), so werden bekanntlich alle Oestrogene rasch aus dem Blut in das Gewebe transportiert, wo sie im allgemeinen nicht deponiert, sondern entweder abgebaut (Leber: Bindung an Glucuronsäure oder Sulfat) oder ausgeschieden werden (Niere: 80 %). Ein Teil der konjugierten Oestrogene gelangt über die Galle in den Darm, von wo aus sie wiederum z. T. rückresorbiert, z. T. in den Faeces ausgeschieden werden.

Detaillierte Aufklärungsarbeit am Coeruloplasmin (2, 7, 16 a, b; 17 a, b, d; 23, 25, 26) hat zu der Erkenntnis geführt, daß dieses α_2 -Globulin immunologisch zwar einheitlich, biochemisch aber aus mindestens zwei Komponenten aufgebaut ist. Es handelt sich dabei um die von RICHTERICH und Mitarb. dargestellten Isoenzyme Coeruloplasmin- C und D (vergl. Tabelle 3).

Tabelle 3 :

Biochemische Eigenschaften der Coeruloplasmin- Isoenzyme

	C	D
Molekulargewicht	148 000	125 000
Bindung von Cu - Atomen pro Molekül	8 Atome	6 Atome
KH - Gehalt	7 %	3,2 %
Oestrogen - Abhängigkeit	+	Ø
Oxydase-Aktivität	(+)	+

Von Bedeutung scheint hier die Tatsache zu sein, daß nur eine der beiden Komponenten oestrogenabhängig ist, nämlich Coeruloplasmin C, daß aber dieses Isoenzym relativ weniger stark oxydaseaktiv ist. Es muß weiterhin erwähnt werden, daß Oestrogene nicht nur die Coeruloplasmin-C-Fraktion, sondern auch freies Kupfer aktiviert haben (1, 13, 19, 27, 30).

Wiewohl die Leberzelle nach allgemeiner Auffassung eine außerordentlich hohe funktionelle Potenz in bezug auf Entgiftungs- und Koppelungsvorgänge besitzt, was u. a. auf die Bindungsfähigkeit von Oestrogenen zutrifft (20, 31), muß dennoch diskutiert werden, daß bei zu hohem Oestrogenangebot die Kupferabspaltungsfunktion aus Coeruloplasmin blockiert wird. Coeruloplasmin würde somit als komplettes oxydaseaktives Protein im Blut verbleiben und angereichert werden.

Die andere Möglichkeit wäre darin gegeben, daß die oestrogenabhängige Coeruloplasminfraktion unter dem regulatorischen Einfluß dieses Hormons aus Geweben freigesetzt und dem Blut zugeführt wird, eine Hypothese, die allerdings der exakten Beweisführung noch bedarf.

Schließlich muß an Zusammenhänge zwischen einer Verschiebung von Chlorid-Ionen und der enzymatischen Coeruloplasminaktivität gedacht werden, die HOLMBERG und LAURELL in ihren Grundlagenarbeiten über das Coeruloplasmin bereits 1951 herausgestellt haben (17 d). Demnach wird die Oxydaseaktivität des Coeruloplasmins durch verschiedene Säuren, aber auch durch die Anreicherung von Chlorid-Ionen eingeschränkt bis aufgehoben. Unter der Wirkung von Oestrogenen weist die Ödembildung in den Geweben auf eine relative Anreicherung von Mineralien insbesondere NaCl im Gewebe hin. Die genannten Mineralien werden demnach dem peripheren Blut entzogen, es kommt zu einer Verminderung der Chlorid-Ionen und damit zu einer Aufhebung des Kontrollmechanismus der Oxydasewirkung und nach den Erfahrungen der oben zitierten Forschergruppe zu einer erhöhten Fermentaktivität.

Die histologischen Befunde haben keine morphologisch faßbaren Veränderungen an den hier untersuchten Organen gezeigt, woraus der Schluß gezogen werden kann, daß die Korrelationen Oestrogene - Coeruloplasmin rein funktioneller Art sind. Über Rückwirkungen auf Organe im Sinne von parenchymatösen Spätmanifestationen kann allerdings auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nichts Endgültiges ausgesagt werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurden insgesamt 20 Albinoratten sowie 18 Kaninchen in die Versuchsserien aufgenommen. Die Ratten wurden in 3 Gruppen eingeteilt: Gruppe A erhielt jeden 2. Tag 5 mg pro Tier durch Injektion eines Oestrogenpräparates subkutan appliziert. Gruppe B erhielt einmal zu Versuchsbeginn 50 mg pro Tier durch Injektion eines Depot- Oestrogenpräparates intramuskulär verabreicht. Gruppe N wurde unbehandelt beobachtet. Die Kaninchen wurden ebenfalls in 3 Gruppen eingeteilt. Die Behandlung erfolgte im Prinzip wie die der Versuchsserie der Ratten. Vor Versuchsbeginn sowie 20 Tage unmittelbar nach Abschluß der Behandlung mit Oestrogenen und schließlich am Ende der Beobachtungszeit, d. h. 30 Tage nach Beginn der Behandlung, wurde allen Tieren Blut entnommen zur Bestimmung der Coeruloplasminkonzentration; diese wurde mit der Oxydase-Ferment-Methode ermittelt. Am Ende des Versuchs wurden sämtliche Tiere im Ätherrausch getötet, entblutet und ihnen folgende Organe entnommen: Leber, Milz, Niere und Ovarien. Von sämtlichen Organen wurden sowohl HE, Turnbull-Blau und Berliner Blau Präparate als auch Nativpräparate mit nachfolgender Oxydasereaktion angefertigt.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, daß unter der Verabreichung von Oestrogenen bei Ratten sowie Kaninchen beiderlei Geschlechts eine deutliche Anhebung des Coeruloplasminspiegels induziert wird, daß jedoch histologisch faßbare Veränderungen an Leber, Niere, Milz und bei weiblichen Tieren

an den Ovarien nicht objektiviert werden können. Es konnten an den Organen weder Abweichungen in den oxydaseaktiven Strukturen noch in der Ablagerung von Eisen, aber auch nicht in bezug auf die parenchymatöse Beschaffenheit gegenüber unbehandelten Tieren festgestellt werden.

In der Diskussion wird versucht, die funktionelle Korrelation zwischen Oestrogenen und Coeruloplasmin unter Berücksichtigung der einschlägigen Literatur zu erklären.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) ADHAM, N.F., P. WILDING, J. MEHL and B.J. HAVERBACK
Alpha-2 macroglobulin levels in human serum.
J. Lab. Clin. Med. 70, 271 (1967)
- 2) BROMAN, L.
Separation and characterization of two Coeruloplasmins from human serum.
Nature (London) 182, 1655 (1958)
- 3) BROWN, J.B.
Oestrogens in the human female.
In: Modern trends in human reproductive physiology.
Butterworths, London (1963)
- 4) BROWN, J.B., G.P. CREHN and J. GINSBURG
Oestrogen metabolism and excretion in severe liver disease.
Gut 5, 56 (1964)
- 5) BURCK, H.-CH.
Histologische Technik.
Georg Thieme, Stuttgart 2. Aufl. (1969)
- 6) CARRUTHERS, M.F., C.B. HOBBS and R.L. WARREN
Raised serum copper and ceruloplasmin levels in subjects taking oral contraceptives.
J. Clin. Path. 19, 498-500 (1966)
- 7) CARTWRIGHT, G.E.
In: Copper Metabolism.
W.D. McELROY and B. GLASS:
The John Hopkins Press, Baltimore 1950, S. 274
- 8) DICZFALUSY, E. und C. LAURITZEN
Oestrogene beim Menschen.
Springer, Berlin (1961)
- 9) DOE, R.P., H.H. ZINNEMAN, E.B. FLINK and R.A. ULSTROM
Significance of the concentration of nonprotein-bound plasma cortisol in normal subjects, Cushing's syndrome, pregnancy and during oestrogen therapy.
J. Clin. Endocrinol. 20, 1484 (1960)
- 10) DOWLING, I.T., N. FREINKEL and S.H. INGBAB
Effect of diethylstilboestrol on the binding of thyroxine in serum.
J. Clin. Endocrinol. 16, 1491 (1956)

- 11) ELSNER, P. and O. HORNYKIEWICZ
Die Beeinflußbarkeit der p- Polyphenoloxydase-
aktivität des menschlichen Blutserums durch Sexual-
hormone.
Arch. Gynäk. 185, 251 (1954)
- 12) ENGBRING, N.H. and W.W. ENGSTROM
Effects of estrogens on serum precipitable iodine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81, 582 (1952)
- 13) GAULT, M.H., J. STEIN and A. ARONOFF
Serum ceruloplasmin in hepatobiliary and other dis-
orders: Significance of abnormal values.
Gastroenterology 50, 8 (1966)
- 14) GRABAR, P. und P. BURTIN
Immunoelktrophoretische Analyse.
Elsevier, Amsterdam (1964)
- 15) GUBLER, C.H., M.E. LAHEY, G.E. CARTWRIGHT and M.M. WINTROBE
Studies on copper metabolism.
IX. The transportation of copper in blood.
J. Clin. Invest. 32, 405-414 (1953).
- 16) HITZIG, W.H.
a) Das Bluteiweißbild beim gesunden Säugling. Spezi-
fische Proteinbestimmungen mit besonderer Berück-
sichtigung immunochemischer Methoden.
Helv. paed. Acta 16, 46 (1961)
- 16) HITZIG, W.H.
b) Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin.
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
(1963) S. 52/53
- 17) HOLMBERG, C.G. and C.B. LAURELL
a) Investigation in Serum Copper.
I. Nature of Serum Copper and its Relation to the
iron-binding Protein in Human Serum.
Acta Chem. Scand. (Stockholm) 1, 944 (1947)
- 17) HOLMBERG, C.G. and C.B. LAURELL
b) Investigation in Serum Copper.
II. Isolation of the Copper containing Protein, and
Description of some of its Properties.
Acta Chem. Scand. (Stockholm) 2, 550 (1948)

- 17) HOLMBERG, C.G. and C.B. LAURELL
c Investigation in Serum Copper.
III. Coeruloplasmin as an Enzyme.
Acta Chem. Scand. (Stockholm) 5, 476 (1951)
- 17) HOLMBERG, C.G. and C.B. LAURELL
d Investigation in Serum Copper.
IV. Effect of Different Anions on the Enzymatic
Activity of Coeruloplasmin.
Acta Chem. Scand. (Stockholm) 5, 921 (1951)
- 18) JAMES, K., G. JOHNSON and I.H. FUDENBERG
The quantitative estimation of alpha-2-macroglobulin in normal, pathological and cord sera.
Clin. Chim. Acta 14, 207 (1966)
- 19) LAHEY, H.E., C.J. GUBLER, G.E. CARTWRIGHT and M.M. WINTROBE
Studies on copper metabolism.
VII. Blood copper in pregnancy and various pathologic states.
J. Clin. Invest. 32, 329 (1953)
- 20) LIEBERMAN, S., H.J. TAGNON and P. SCHULMAN
The in vitro metabolism of estrogens by the liver studied by means of a colorimetric method.
J. Clin. Invest. 31, 341 (1952)
- 21) MARKOWITZ, H., C.J. GUBLER, J.P. MAHONEY, G.E. CARTWRIGHT and M.M. WINTROBE
Studies on copper metabolism.
XIV. Copper, coeruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. 34, 1498 (1955)
- 22) MILLS, I.H., H.P. SCHEDL, P.S. CHEN and F.C. BARTTER
The effect of estrogen administration on the metabolism and protein binding of hydrocortisone.
J. Clin. Endocrinol. 20, 515 (1960)
- 23) MORELL, A.G. and I.M. SCHEINBERG
Heterogeneity of human coeruloplasmin.
Science 131, 930 (1960)
- 24) PEARLMAN, W.H.
Circulating steroid hormone levels in relation to steroid hormone production.
In: Ciba Found. Coll. on Endocr. 11, 233-245 (1957)

- 25) RICHTERICH, R., A. TEMPERALI and H. AEBI
Coeruloplasmin-Komponenten.
Die Heterogenität des Coeruloplasmins: Isolierung und Charakterisierung von zwei Cupro-Proteinen aus Humanserum.
Biochim. Biophys. Acta 56, 240 (1962)
- 26) RICHTERICH, R., E. GAUTIER, H. STILLHART and E. ROSSI
The heterogeneity of caeruloplasmin and the enzymatic defect in Wilsons disease.
Helv. paed. Acta 15, 424 (1960)
- 27) RUSS, E.M. and J. RAYMUNT
Influence of estrogens on total serum copper caeruloplasmin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 465 (1956)
- 28) SANDBERG, A. and M.R. SLAUNWHITE
Studies on phenolic steroids in human subjects.
II. The metabolic fate and hepato-biliary enteric circulation of C ¹⁴-estrone and C ¹⁴-estradiol in women.
J. Clin. Invest. 36, 1266 (1957)
- 29) SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und F. CZAGANY
Zur quantitativen Bestimmung der Coeruloplasmin-konzentration im Serum.
Med. Welt 28, S. 1449-1453 (1961)
(F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart)
- 30) STUDNITZ, W. von, and D. BEREZIN
Studies on serum copper during pregnancy, during the menstrual cycle, and after the administration of estrogens.
Acta endocrinol. 27, 245 (1958)
- 31) TAGNON, H.J., S. LIEBERMAN, P. SCHULMAN, and A. BRUNTSCHWIG
The metabolism of estrogens by the human liver studied in vitro.
J. Clin. Invest. 31, 346 (1952)
- 32) THOMPSON, R.H.S. and D. WATSON
zitiert nach :
CARRUTHERS, M.E., C.B. HOBBS and R.L. WARREN
Raised serum copper and ceruloplasmin levels in subjects taking oral contraceptives.
J. Clin. Path. 19, 498-500 (1966)
J. Clin. Path. 2, 193 (1949)

- 33) TURPIN, R., H. SCHMITT-JUBEAU et H. JÉRÔME
Action du diéthylstilboestrol sur la enprémie.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 144, 352 (1950)
- 34) UFER, J.
Hormontherapie in der Frauenheilkunde.
3. Aufl. De Gruyter, Berlin (1966)
- 35) URIEL, I., H. GÖTZ et P. GRABAR
Etude de la céruloplasmine du sérum humain par
l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-
électrophorétique.
Microdétection colorimétrique du cuivre lié aux
protéins.
Schweiz. med. Wschr. 1957, 431
- 36) WYNN, V.I., W.H. DOAR, G.L. MILLS and T. STOKES
Fasting serum triglyceride, cholesterol, and
lipoprotein levels during oral-contraceptive
therapy.
Lancet 7624/II, 756 (1969)

Für die Überlassung des Themas sowie für die Übernahme des Referates möchte ich Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth meinen besten Dank aussprechen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. Hilde Götz für die Anleitung zum experimentellen Teil der Arbeit sowie für die Überarbeitung der gesamten Dissertation.

L e b e n s l a u f

Am 21. August 1946 wurde ich als zweites Kind des Sparkassenbeamten Hans Ehrmeier und seiner Ehefrau Josepha, geb. Rupp, in Ingolstadt/Donau geboren.

1952 wurde ich in Ingolstadt in die Volksschule St. Moritz eingeschult. 1956 bestand ich die Aufnahmeprüfung zum Christoph-Scheiner-Gymnasium und legte dort 1965 das Abitur ab. Von Anfang Oktober 1965 bis Ende September 1966 leistete ich meinen verkürzten 12-monatigen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1966 bekam ich einen Studienplatz für Humanmedizin in Erlangen. An der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg legte ich das Vorphysikum und 1969 das Physikum ab.

Am 5. Juli 1972 bestand ich das Medizinische Staatsexamen mit der Note "sehr gut".

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hegl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990